

بررسی فتوتیپ و عمل لنفوسیت های T در افراد ۳۰-۱۰ ساله و ارتباط تغییرات آن با سن

بتول پورقصری^{۱*}، لیلا کریمی^۲

گروه پاتولوژی و هماتولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۲

چکیده:

زمینه و هدف: ایمنی همراه با افزایش سن تغییر می کند که در نهایت به پیری ایمنی منجر می شود. این پدیده در لنفوسیت های T با تغییرات فتوتیپی و عملکردی همراه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فتوتیپ لنفوسیت های T و تعیین داخل سلولی IL2 و IFN γ در یک گروه از افراد سالم و همبستگی تغییرات آن ها با سن بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، خون از ۲۶ فرد سالم گرفته شد تعیین IL2 و IFN γ داخل سلولی به شیوه تعیین سائتو کین ها انجام شد. فتوتیپ ایمنی لنفوسیت های با فلوسایتومتری بررسی گردید. داده های به دست آمده از شمارش کامل خونی و سایر داده های موجود با آمار توصیفی و آزمون همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها: نسبت لنفوسیت T $14/87 \pm 05/81$ ، تعداد لنفوسیت CD4 $294/5 \pm 644/15$ و تعداد لنفوسیت TCD8، $155/44 \pm 417/04$ در میلی متر مکعب بود. میزان لنفوسیت های CD4 بیان کننده هر یک از شاخص های CD27، CD28، CD57، CCR7 و نسبت های سلول های تولید کننده IL2 و IFN γ بیش از میزان آن ها در زیر گروه CD8 بود. از شاخص های بررسی شده تنها بین میزان سلول های CD8+CCR7 و سن همبستگی منفی معنی دار دیده شد.

نتیجه گیری: یافته های مطالعه نشان می دهد که تغییرات فتوتیپی مرتبط با کاهش لنفوسیت بکر و خاطره ای مرکزی و افزایش لنفوسیت های خاطره ای اجرایی (که همراه با پیری ایمنی است) ظاهراً در دوران جوانی با سن همبستگی معنی دار ندارد. برای داشتن اطلاعات فراگیرتر، مطالعه فتوتیپ و عمل سیستم ایمنی در گروه های مختلف جوان و پیر پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: فتوتیپ لنفوسیت T، پیری ایمنی، تعیین داخل سلولی سائتو کین، IL2، IFN γ .

مقدمه:

پیری ایمنی می تواند به صورت زودرس در افراد جوان به علت التهابات مزمن، عفونت ها و شرایط نئوپلاستیک رخ دهد (۲). ویژگی مشخص پیری ایمنی تجمع لنفوسیت های با فتوتیپ خاطره ای تمایز یافته یا خاطره ای اجرایی با فتوتیپ های CD28-CD27 یا CD28+CD27- و کاهش تعداد لنفوسیت های T بکر با فتوتیپ CD28+CD27 است (۳-۵). تعداد لنفوسیت های بکر در هر دو گروه CD4 و CD8 با

همزمان با سالخوردگی بدن، سیستم ایمنی نیز دچار پیری می گردد. کاهش تدریجی پاسخ دهی به آنتی ژن ها و پیری لنفوسیت های T در اثر پیری سیستم ایمنی مشاهده می شود. این پدیده به عنوان یک مشکل در بازسازی زیر جمعیت های لنفوسیت ها و عملکرد آن ها در نظر گرفته می شود. از این رو تغییرات فتوتیپی لنفوسیت ها و تغییرات سیتو کین ها با پیری ایمنی همراه می گردد و از اهمیت پیش آگهی برخوردار است (۱).

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- گروه پاتولوژی و هماتولوژی- تلفن:

است، افزایش محسوس لنفوسیت های CD4+ تولید کننده اینترفرون گاما در پاسخ به آنروتوکسین B استافیلوکوک در افراد سالخورده دیده شده است (۱۷). سوالی که مطرح می گردد، این است که آیا پیشرفت به سمت تغییرات مناسب با پیری ایمنی در فتوتیپ و عملکرد لنفوسیت های T تدریجی است و از سنین پایین شروع می گردد یا در جوانی این تغییرات نامحسوس است و در سنین پیری به سرعت اتفاق می افتد؟ در مطالعه حاضر تغییرات فتوتیپی مرتبط با پیری ایمنی در لنفوسیت های T در یک گروه سنی از افراد سالم ۳۰-۱۰ ساله تعیین و همبستگی آن با سن بررسی شده است. علاوه بر این IL2 و IFN γ از سایتوکین های تیپ ۱ نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی:

این مطالعه ی توصیفی به صورت مقطعی، بر روی نمونه ۲۶ فرد سالم در گستره سنی ۳۰-۱۰ با میانگین ۱۹/۶۶±۴/۷۵ سال انجام شد. از افراد مورد مطالعه پس از گرفتن رضایت نامه ی آگاهانه، ۵ سی سی نمونه ی خون وریدی گرفته شد که در دو لوله ی جداگانه یکی هپارینه و دیگری دارای ضد انعقاد EDTA ریخته شد. برای اندازه گیری شاخص های هماتولوژیک، پس از جمع آوری نمونه ها در لوله ی حاوی ضد انعقاد EDTA شمارش خونی با شمارشگر سلولی Sysmex 800 سنجش شد.

تعیین داخل سلولی سیتوکین ها با استفاده از متد تعریف شده قبلی انجام شد (۱۸). نمونه خون حاوی EDTA قبل از استفاده در دمای اتاق نگهداری و در طی ۸ ساعت پس از جمع آوری استفاده شد. در یک لوله پروپیلن ۱۵ میلی لیتری ۰/۵ میلی لیتر خون کامل هپارینه، ۵ میکرولیتر SEB (غلظت نهایی ۱ میکرو لیتر/ میلی لیتر) و ۵ میکرو لیتر آنتی بادی مونوکلونال Anti- CD28 اضافه گردید. در لوله دوم ۱۵ میلی لیتری نیز خون کامل هپارینه و آنتی بادی مونوکلونال Anti- CD28 (غلظت نهایی ۱ میکرو گرم/ میلی لیتر)

افزایش سن به طور پیش رونده کاهش نشان داده است و این نقصان در سن ۹۰-۷۰ سالگی در لنفوسیت های CD4 به میزان ۴ برابر و در لنفوسیت های CD8 به میزان ۳-۲ برابر نسبت به سنین جوانی بوده است (۶). در سنین پیری لنفوسیت های بکر CD95- با سلول های CD28- جایگزین می گردد. علاوه بر این افزایش جمعیت لنفوسیت های T مثبت از نظر سیتوکین های تیپ (IL2, IFN γ , TNF α) I دیده می شود (۷). لنفوسیت های CD4+CD27-CD28- در تحریک با آنروتوکسین B استافیلوکوک تکثیر کمتری نسبت به لنفوسیت های CD4+CD28+CD27- دارند (۸). افزایش جمعیت لنفوسیت های CD4+CD57+ نیز در کهنسالی گزارش شده است (۷،۹،۱۰). افزایش بیان این گلیکو پروتئین به عنوان علامتی از حساسیت به اپوپتوز شناخته می شود (۱۱). لنفوسیت های CD3+CD57+ نسبت به اپوپتوز القاء شده بر اثر تحریک سلول حساس تر از لنفوسیت های CD3+CD57- هستند (۱۲). مولکول CCR7 نیز به عنوان شاخصی از جداسازی لنفوسیت های بکر از خاطره ای اجرایی شناخته می شود (۷،۱۳). تعیین تولید سایتوکین یک نشانگر با ارزش در مطالعه پاسخ ایمنی نسبت به محرک های ایمنولوژیک است. سایتوکین ها در گیر در تنظیم سیستم ایمنی هستند. لنفوسیت های T خاطره ای CD4، پاسخ های ایمنی در برابر پاتوژن ها را اساساً از طریق ترشح سایتوکین هدایت می کنند. الگوی تولید سایتوکین می تواند در تشخیص عمل طبیعی یا غیر طبیعی سلول های T استفاده شود و اطلاعاتی در خصوص پاسخ به پاتوژن فراهم می کند (۱۴،۱۵) و نیز تغییرات وابسته به سن در آن ها دیده می شود (۱۶). Zanni و همکاران نشان داده اند که افزایش داخل سلولی سایتوکین های تیپ ۱ در لنفوسیت های CD8+ وابسته به سن است، اما افزایش سایتوکین های تیپ ۲ تنها در زیر گروه خاطره ای دیده می شود (۱۵). در مطالعه ای که تولید داخل سلولی IL2 و اینترفرون گاما را در افراد سالخورده و جوان CMV+ مقایسه نموده

سلول ها بر اساس مارکر مورد نظر، شمارش شدند؛ در انتها داده های فلوسایتو متریک با نرم افزار Flowmax، آنالیز گردیده و سپس با توجه به شمارش سلولی انجام شده ی قبلی، تعیین تعداد مطلق انجام شد.

آنتی بادی های مورد استفاده شامل Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD3, Anti-CD57, Anti-CD27, Anti-CD28, Anti-CCR7, Anti-IL2, Anti-IFN γ از شرکت Becton-Dickinson خریداری گردید. SEB و BFA از سیگما و محلول های لیز کننده و نفوذ پذیر کننده نیز از Becton-Dickinson تهیه شد. داده های محاسبه شده بر اساس شمارش کامل خونی و یافته های فلوسایتومتری و سایر تست های آزمایشگاهی با نرم افزار SPSS و با روش های آماری توصیفی و آزمون همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها:

افراد مورد مطالعه شامل یک گروه ۲۶ نفره از افراد سالم با میانگین سنی ۱۹/۶۶ شامل ۵۷/۷٪ مرد بودند. میانگین سنی مردان و زنان تفاوت آماری نداشت. میانگین تعداد گلبول قرمز $10.6 \pm 0.64 \times 10^6$ و هموگلوبین آن ها 13.79 ± 1.20 گرم در صد میلی لیتر بود.

جدول شماره ۱: شاخص های ایمنولوژیک در

افراد مورد مطالعه

شاخص	میانگین \pm انحراف معیار
تعداد لوکوسیت در میلی متر مکعب	$5134/13 \pm 818/89$
تعداد لنفوسیت در میلی متر مکعب	$2122/21 \pm 543/7$
درصد لنفوسیت CD3+	$54/81 \pm 14/87$
تعداد لنفوسیت CD4+T در میلی متر مکعب	$644/15 \pm 294/5$
تعداد لنفوسیت CD8+T در میلی متر مکعب	$417/04 \pm 155/44$

آزمون Mann-Whitney

شمارش گلبول های سفید (WBC) در افراد مورد مطالعه $5134/13 \pm 818/89$ در میلی متر مکعب بود که از این تعداد $12 \pm 43/8$ ٪ آن لنفوسیت بود. در گستره خون محیطی افراد مورد مطالعه تغییر

اضافه گردید. هر دو لوله به آرامی مخلوط و سپس ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی CO₂ ۵٪، انکوبه شد. BFA) Berefeldin A) به هر دو لوله اضافه و به آرامی مخلوط گردید و ۴ ساعت دیگر انکوبه شد. ۵۰ میکرو لیتر محلول EDTA به هر لوله اضافه و به شدت تکان داده شد، سپس ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس مجدداً ۱۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند. ۵ میلی لیتر از محلول لیز کننده به هر لوله افزوده و به آرامی تکان داده شد تا به خوبی مخلوط گردید، در ادامه ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس با نیروی g ۵۰۰ به مدت ۵-۷ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. پس از شستشو و تخلیه مایع رویی، محلول نفوذ پذیر کننده به هر لوله افزوده و به آرامی تکان داده شد تا به خوبی مخلوط گردید، سپس ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس سانتریفوژ گردید. پس از شستشوی مجدد ۱۰ میکرو لیتر از آنتی بادی اختصاصی سائیتوکاین به لوله ها افزوده شد (Anti-CD3) برای تعیین جمعیت لنفوسیت های T، Anti-CD4 برای تعیین جمعیت لنفوسیت های T کمکی و Anti-CD8 برای تعیین جمعیت لنفوسیت های T سائیتوتوکسیک و Anti-IL2 و Anti-IFN γ برای سنجش سائیتوکاین استفاده شدند). همه لوله ها ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه و در نهایت شستشو شدند.

برای بررسی بیومارکرهای CD28, CD27, CD57

و CCR7 نمونه ی خون در لوله ی حاوی ضد انعقاد سدیم هپارین، جمع آوری شده و با استفاده از بافر آمونیوم کلراید، RBCs باقی مانده در طول مراحل آماده سازی سلول های تک هسته ای، لیز گردید. جهت رنگ آمیزی، سلول ها با آنتی بادی مونوکلونال کوئزوگه مجاور و سپس در دمای ۴ درجه و در تاریکی، انکوبه شده و پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول ها را شسته و در پارافرمالدید، فیکس و تا زمان آنالیز فلوسایتومتری، در دمای ۴ درجه و در تاریکی، نگهداری کردیم.

غیر طبیعی در لوکوسیت ها مشاهده نشد. نسبت
گروه های CD4 و CD8 در جدول شماره ۱ دیده
لنفوسیت های CD3+ و نیز میزان هر یک از زیر
می شود.

جدول شماره ۲: تعداد سلول های بیان کننده هر یک از شاخص های فنوتیپی و نیز نسبت تولید کننده IL2 و

IFN γ در لنفوسیت های CD4 و CD8

شاخص	در لنفوسیت های CD4	در لنفوسیت های CD8
CD27	۴۷۶/۹۵±۲۵۵/۳۳	۲۹۸/۶۸±۱۱۹/۳۴
CD28	۴۷۷/۶۴±۲۶۹/۶۴	۲۵۶/۹۳±۱۲۳/۹۶
CD57	۱۱۷/۲۷±۶۷/۲۸	۸۳/۱۵±۶۴/۰۱
CCR7	۳۰۶/۴۰±۲۳۲/۳۳	۱۵۶/۲۲±۱۰۲/۰۴
IL2	۸/۱۴±۵/۶۰	۳/۷۹±۳/۱۱
IFN- γ	۳/۷۰±۳/۷۵	۲/۸۴±۲/۷۸

میزان لنفوسیت های T مثبت از نظر هر یک
از شاخص های فنوتیپی و نیز لنفوسیت های T
تولید کننده IL2 و IFN γ مورد بررسی قرار گرفت
(جدول شماره ۲). میزان لنفوسیت های CD4 مثبت
از نظر هر یک از مارکهای فنوتیپی CD27،
CD28، CD57، CCR7 و نسبت سلول های
تولید کننده IL2 و IFN γ بیش از میزان آن ها در
زیر گروه CD8 بود.

جدول شماره ۳: بررسی همبستگی بین تعداد لنفوسیت های T بیان کننده هر یک از شاخص های فنوتیپی

مورد بررسی با سن، تعداد لنفوسیت T، لنفوسیت CD3+CD4+ و CD3+CD8+

نوع سلول	سن	تعداد لنفوسیت T	تعداد لنفوسیت CD3+CD4+	تعداد لنفوسیت CD3+CD8+
CD4+CD27+	۰/۱۲	۰/۸۶	۰/۹۰	۰/۵۰
ارزش P	NS	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	NS
CD8+CD27+	۰/۲۲	۰/۹۳	۰/۹۲	۰/۵۹
ارزش P	NS	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۴
CD4+CD28+	۰/۰۷	۰/۹۴	۰/۹۸	۰/۵۶
ارزش P	NS	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۶
CD8+CD28+	۰/۵۳	۰/۸۳	۰/۷۷	۰/۶۴
ارزش P	۰/۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۲
CD4+CD57+	۰/۰۱	۰/۶۹	۰/۷۱	۰/۲۲
ارزش P	NS	۰/۰۱	۰/۰۰۹	NS
CD8+CD57+	۰/۰۳	۰/۵۳	۰/۴۹	۰/۷۲
ارزش P	NS	۰/۰۸	NS	۰/۰۰۸
CD4+CCR7+	۰/۱۴	۰/۶۶	۰/۷۱	۰/۲۷
ارزش P	NS	۰/۰۲	۰/۰۰۹	NS
CD8+CCR7+	۰/۵۹	۰/۵۰	۰/۴۹	۰/۲۳
ارزش P	۰/۰۴	۰/۰۹	NS	NS

آزمون همبستگی اسپیرمن.

با تعداد لنفوسیت T و تعداد لنفوسیت CD4 ارتباط معنی دار داشت. تعداد لنفوسیت های T بیان کننده شاخص های CD27، CD28، CD57 با تعداد لنفوسیت CD8 رابطه معنی دار داشت. میزان سلول های بیان کننده هیچ یک از شاخص های مورد بررسی با نسبت سلول های تولید کننده IL-2 و IFN γ ارتباط معنی دار نداشت (نتایج در جدول آورده نشده است)؛ همچنین بین نسبت سلول های تولید کننده IL-2 و IFN γ با سن ارتباط معنی دار مشاهده نگردید.

همبستگی میزان سلول های بیان کننده هر یک از شاخص های فنوتیپی با سن، تعداد لنفوسیت T و زیر گروه های CD4 و CD8 بررسی گردید که نتایج آن در جدول شماره ۳ دیده می شود. همانگونه که در جدول مشاهده می شود از بین شاخص های مورد مطالعه، تنها میزان سلول های CD8+CCR7 با سن رابطه معکوس معنی دار داشت و سایر شاخص ها با سن رابطه ای نداشت. تعداد لنفوسیت های T بیان کننده شاخص های مورد بررسی به جز CCR7 و CD57 در زیر گروه CD8

جدول شماره ۴: بررسی همبستگی بین سلول های تولید کننده IL2 و IFN γ در زیر گروه های TCD4 و TCD8 با یکدیگر

IFN γ (CD8)	IL2(CD8)	IFN γ (CD4)	IL2(CD4)
۰/۵۶	۰/۷۵	-۰/۰۰۳	IL2(CD4)
۰/۰۰۹	<۰/۰۰۱	NS	
۰/۵۱	۰/۰۶		-۰/۰۰۳ IFN γ (CD4)
۰/۰۰۸	NS		NS
۰/۴۵		۰/۰۶	۰/۷۵ IL2(CD8)
۰/۰۴		NS	<۰/۰۰۱
	۰/۴۵	۰/۵۱	۰/۵۶ IFN γ (CD8)
	۰/۰۴	۰/۰۰۸	۰/۰۰۹

بین نسبت لنفوسیت های CD4 و CD8 بیان کننده IL2 و نیز نسبت لنفوسیت های CD4 و CD8 بیان کننده IFN γ همبستگی معنی دار وجود داشت.

بحث:

CD4 به CD8 این یافته قابل انتظار است. شواهد نشان می دهد که لنفوسیت های CD8+CD28 نقش مهمی در بیماری هایی که همراه با فعال شدن مزمن سیستم ایمنی است و نیز با تغییرات مرتبط با سن در سیستم ایمنی دارد و تغییرات فنوتیپی مرتبط با پیری نقش مهمی در بیماری های مرتبط با سیستم ایمنی دارد (۱۹،۱۲). افزایش لنفوسیت های (CD4+CD57+) (CD4+CD28-) نیز در تحریکات مزمن سیستم ایمنی مشاهده شده است (۱۲). بر اساس نقطه نظر AKbar و همکاران، لنفوسیت های T کاملاً تمایز یافته در هر دو زیر گروه CD4 و CD8 مولکول های CD27 و CD28 را از دست

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در افراد مورد مطالعه نسبت لنفوسیت های CD3 بیش از ۵۰٪ و نسبت CD4 به CD8، ۱/۵۴ است. این نتایج همسو با سایر یافته های قبلی است که CD3+ با گذشت سن کاهش می یابد و نیز در افراد جوان سالم نسبت CD4 به CD8 بیش از ۱ است و در سنین پیری این نسبت کاهش یافته و ممکن است معکوس گردد (۶). در بررسی فنوتیپ لنفوسیت های CD4 و CD8 میزان لنفوسیت های بیان کننده هر یک از شاخص های فنوتیپی CCR7، CD27، CD28، CD57 در زیر گروه CD4 بیش از CD8 بود که با توجه به نسبت

می دهند، اما سلول های CD8 ابتدا CD28 و سپس CD27 را از دست می دهند و در سلول های CD4 این مسیر بر عکس است (۲۰). تحریک مزمن آنتی ژنیک منجر به تجمع تدریجی سلول های T الیگوکلونال اختصاصی آنتی ژن که در مراحل نهایی تمایز هستند، به ویژه در زیر گروه CD8 می گردد. این سلول ها با کوتاه شدن طول تلومر، از دست دادن CD28 یا بیان CD57 مشخص می گردند و افزایش سلول های CD3+CD57+ از اهمیت بالینی برخوردار است (۱۲، ۲۱). بر اساس مطالعه Kovaïou و همکاران، افراد پیر درصد پایین تری از لنفوسیت های CD4+CD28+CD27+، اما درصد بالاتری از سلول های CD4+CD28+CD27- و CD4+CD28-CD27- دارند. گروه اخیر در همه افراد پیر به نسبت های مختلف وجود دارد، در حالی که این زیر گروه در افراد جوان تنها در افراد کمی دیده می شود (۸). به نظر می رسد لنفوسیت های خاطره ای اجرایی در هنگام برخورد با آنتی ژن مولکول های CD27 خود را از دست داده اند (۲۲). سلول های با مقادیر زیاد CD27 در بین لنفوسیت های اختصاصی ویروس یافت نشده است که نشان می دهد در زمان مواجهه با آنتی ژن آن را از دست داده اند (۲۳). هر دو زیر گروه سلول های خاطره ای CD27- هستند (۲۴). با توجه به اینکه گروه مورد مطالعه ما افراد سالم بودند، ما همبستگی بین میزان هر یک از زیر گروه های لنفوسیتی بیان کننده شاخص های فوق را با سن بررسی نمودیم و همانگونه که در جدول شماره ۳ مشاهده می گردد بین فراوانی لنفوسیت های CD4 و CD8 بیان کننده ۳ شاخص فوق با سن در هیچ مورد همبستگی وجود نداشت، اما بین این فراوانی و تعداد کل لنفوسیت ها ارتباط معنی دار مشاهده گردید که قابل انتظار است. ظاهراً در گروه سنی مورد مطالعه ما تأثیر تغییرات سن بر تغییر زیر گروه های لنفوسیت T بیان کننده شاخص های فتوتیپی محسوس نبوده است که بتواند همبستگی معنی دار نشان دهد. با توجه به اینکه تعداد افراد مورد مطالعه ما محدود بوده است، ممکن است نیاز به بررسی

بیشتر جهت یافتن نتایج جامع تری از ارتباط بین تغییرات این زیر گروه ها و سن باشد. در بررسی همبستگی بین فراوانی لنفوسیت های T بیان کننده فتوتیپ CCR7 و سن، همبستگی منفی معنی دار در لنفوسیت های CD8 مشاهده گردید (جدول شماره ۳). CCR7 یکی از شاخص های است که در تشخیص لنفوسیت های بکر و اجرایی استفاده می شود. بر اساس یک تعریف لنفوسیت های بکر یا خاطره ای مرکزی CCR7+ و لنفوسیت های خاطره ای اجرایی CCR7- هستند که با توجه به بیان CD27 خود این گروه نیز به دو دسته تقسیم می گردند (۱۱، ۲۵). لنفوسیت های CD4+ تعداد و تغییرات خود به سمت لنفوسیت های خاطره ای اجرایی CD45-CCR7 را تا مدت زیادی به تعویق می اندازند و تغییرات محسوس در دهه ۷۰ اتفاق می افتد (۲۶). این موضوع می تواند عدم همبستگی بین فراوانی لنفوسیت های CD4+CCR7+ و سن را در مطالعه ما توضیح دهد. در بیماران آلوده شده با HIV، بیماران با تعداد بیشتری ویروس، دارای فراوانی بیشتری از لنفوسیت های CD4-CCR7 بوده اند که تأیید کننده کاهش لنفوسیت های بکر و خاطره ای مرکزی است (۷).

تغییرات میزان سایتوکین ها نیز به عنوان یکی از تغییرات همراه با افزایش سن مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه Zanni و همکاران در افراد مسن، افزایش داخل سلولی سایتوکین های تیپ ۱ و ۲ در همه زیر گروه های لنفوسیت های CD8 دیده شده است، در حالی که افزایش قابل توجه نوع ۱ همراه با افزایش سن تنها در لنفوسیت های خاطره ای دیده شده است. در این مطالعه گروه های سنی مورد مطالعه تا سنین پیری گسترش داشته است (۱۵). در مطالعه ما نسبت لنفوسیت های تولید کننده IL2 در زیر گروه CD4 بیش از ۲ برابر فراوانی لنفوسیت های بیان کننده IFN γ بود. این موضوع می تواند با این یافته که لنفوسیت های بکر و خاطره ای مرکزی بیش از لنفوسیت های اجرایی از نظر IL2 مثبت هستند،

توجه شود و با توجه به جوان بودن گروه مورد مطالعه می تواند، توضیح داده شود (۷). در مطالعه ای که توسط Kleiner و همکاران صورت گرفته تفاوت میزان سایتوکین های بین کودکان و نوجوانان با بالغین بیش از ۱۸ سال بررسی و مشخص شده است که بعضی از آن ها در بالغین کاهش و بعضی افزایش دارد (۲۷). در مطالعه Alvarez-Rodriguez و همکاران افزایش سن همراه با افزایش IL12, IL13, IL16 و TNFα بوده است (۱۶). در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین میزان سلول های تولید کننده IL2 و IFNγ با سن یافت نشد که احتمالاً دلیل آن می تواند نزدیکی سن افراد مورد مطالعه به یکدیگر باشد. وجود همبستگی بین نسبت لنفوسیت های CD4 و CD8 تولید کننده IL2 با IFNγ در افراد مورد مطالعه بیانگر تغییرات موازی این در زیر مجموعه دو این گروه سنی با یکدیگر می باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به عدم وجود همبستگی معنی دار بین میزان لنفوسیت های T بیان کننده هر یک از

شاخص های فتوتیپی مورد مطالعه با سن در افراد سالم، احتمالاً بروز تغییرات محسوس پیری ایمنی منحصر به سنین پیری است و تغییرات تدریجی جزئی در سنین جوانی در حدی نیست که به صورت معنی دار بروز کند. میزان لنفوسیت های تولید کننده IL2 و IFNγ نیز ظاهراً به همین صورت با سن ارتباط معنی دار نداشت. جهت تکمیل داده های فوق پیشنهاد می گردد، گروه های سنی دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی:

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شده است که بدین وسیله از همکاران مرکز فوق سپاسگزاری می گردد. ضمناً از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که حمایت مالی طرح را بر عهده داشته اند، قدردانی می گردد. این مقاله از طرح شماره ۳۷۸ که در تاریخ ۸۹/۹/۲۱ در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تصویب شده است، استخراج گردیده است.

منابع:

1. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology*. 2008; 23: 64-74.
2. Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity*. 2006; 24(5): 491-4.
3. Chidrawar S, Khan N, Wei W, McLarnon A, Smith N, Nayak L, et al. Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. *Clin Exp Immunol*. 2009; 155(3): 423-32.
4. Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(4): 440-5.
5. Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Lofgren S, et al. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60(5): 556-65.
6. Provinciali M, Moresi R, Donnini A, Lisa RM. Reference values for CD4+ and CD8+ T lymphocytes with naive or memory phenotype and their association with mortality in the elderly. *Gerontology*. 2009; 55(3): 314-21.
7. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999; 401(6754): 708-12.
8. Kovaïou RD, Weiskirchner I, Keller M, Pfister G, Cioca DP, Grubeck-Loebenstien B. Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int Immunol*. 2005; 17(10): 1359-66.

9. DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, et al. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. 2006; 7(5-6): 471-81.
10. Olsson J, Wikby A, Johansson B, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev*. 2000; 121(1-3): 187-201.
11. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003; 101(7): 2711-20.
12. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011; 134(1): 17-32.
13. Calabresi PA, Allie R, Mullen KM, Yun SH, Georgantas RW, 3rd, Whartenby KA. Kinetics of CCR7 expression differ between primary activation and effector memory states of T(H)1 and T(H)2 cells. *J Neuroimmunol*. 2003; 139(1-2): 58-65.
14. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol*. 1995; 154(9): 4294-301.
15. Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, et al. Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2003; 38(9): 981-7.
16. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Munoz-Cacho P, Martinez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*. 2012; 273(2): 124-32.
17. Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA. The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *J Virol*. 2007; 81(14): 7759-65.
18. Pourgheysari B, Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2009; 43(11): 853-61.
19. Vallejo AN. Immune remodeling: lessons from repertoire alterations during chronological aging and in immune-mediated disease. *Trends Mol Med*. 2007; 3(3): 94-102.
20. Akbar AN, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17(5): 480-5.
21. Coppo P, Buffet M, Feger F, Lassoued K. [Polyclonal CD8+/CD57+ T cell expansions: clinical significance]. *Presse Med*. 2013; 42(3): 327-37.
22. Kern F, Khatamzas E, Surel I, Frommel C, Reinke P, Waldrop SL, et al. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol*. 1999; 29(9): 2908-15.
23. Mendez-Lagares G, Diaz L, Correa-Rocha R, Leon Leal JA, Ferrando-Martinez S, Ruiz-Mateos E, et al. Specific patterns of CD4-associated immunosenescence in vertically HIV-infected subjects. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(6): 558-65.
24. Bulati M, Buffa S, Candore G, Caruso C, Dunn-Walters DK, Pellicano M, et al. B cells and immunosenescence: a focus on IgG+IgD-CD27- (DN) B cells in aged humans. *Ageing Res Rev*. 2011; 10(2): 274-84.
25. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing*. 2008; 5: 6.
26. Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(4): 511-5.
27. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 434010.

Evaluation of T cell phenotype and function in 10-30 years old individuals and the correlation of its alteration with age

Pourgheysari B^{1*}, Karimi L²

¹Pathology and Hematology Dept., Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Immunology Dept., Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 17/Jun/2015 Accepted: 13/Jan/2016

Background and aims: Immunity is changed with increasing the age and leads to immunosclerosis in elderly. This phenomenon is associated with the alteration of T cell phenotype and function. The aim of the present study was to investigate T lymphocyte phenotype and intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN γ) and their correlation with age in a group of healthy subjects.

Methods: In this descriptive study, blood was obtained from 26 healthy individuals. IL2 and IFN- γ were determined by intracellular cytokine detection method. T cell immunophenotype was detected using by flow cytometry. Obtained data of complete blood count, flow cytometry and other data were analyzed by descriptive statistics and Spearman correlation test.

Results: T lymphocyte frequency was $54.81 \pm 14.87\%$ and CD4 and CD8 positive T cells were $644.15 \pm 294.5/\text{mm}^3$ and $417.04 \pm 155.44/\text{mm}^3$, respectively. The number of T cell expressing CD27, CD28, CD57 and CCR7 and the frequency of IL2+ and IFN γ + T cells were more in CD4+ subset than CD8+ T cells. Among the investigated phenotypes, only the frequency of CD8+CCR7+ T cells was negatively correlated with age.

Conclusion: The findings demonstrated that T cell phenotype alterations related to the decrease of naïve and central memory T cells and increase of effector memory T cells (associated with immunosclerosis) is not significantly correlated with age in young individuals. For more consistent data, study of the immune function and phenotype is suggested in different young and old groups.

Keywords: T cell phenotype, Immunosclerosis, Intracellular cytokine detection, IL2, IFN γ .

Cite this article as: Pourgheysari B, Karimi L. Evaluation of T cell phenotype and function in 10-30 years old individuals and the correlation of its alteration with age. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(2): 1-9.

***Corresponding author:**

Pathology and Hematology Dept., and Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989133031381, E-mail: bat238@yahoo.com